DOI:10.11931/guihaia.gxzw202312028

水母雪兔子通气组织形成相关基因 *SmPAD*4 的克隆及表达分析

韦鎔宜[1,2,3]，段鹏[4]，李培兰[1,2,3]，罗丹[1,2,3]，史国民[2,3]，
代昊斌[2,3]，李凤珍[1,2,3]，何涛[1,2,3*]
（1. 青海大学 生态环境工程学院，西宁 810016；2. 青海省园林植物与观赏园艺重点实验室，西宁 810016；3. 青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室，西宁 810016；4. 青海大学畜牧兽医科学院，西宁 810016）

摘　要：通气组织是水母雪兔子（*Saussurea medusa*）应对极端环境的适应性结构，其形成通常伴随着细胞程序性死亡（programmed cell death，PCD）的发生，而细胞的死亡与通气组织的形成通常受到 *PAD*4 基因（Phytoalexin deficient 4）的调控，但 *PAD*4 如何调控水母雪兔子通气组织形成的机制仍不明确。本研究以水母雪兔子为试验材料，利用同源克隆和 RACE 技术克隆了通气组织形成相关基因 *SmPAD*4，对其序列、系统进化、表达和亚细胞定位等进行分析，并采用 hi-1IL PCR 技术扩增其启动子，以探讨该基因在环境适应中的功能。结果表明:（1）*SmPAD*4 基因 cDNA 全长为 2 047（GenBank 登录号为 OR766038），包括 1 866 bp 的开放阅读框，编码 621 个氨基酸，分子式（$C_{3163}H_{4906}N_{848}O_{910}S_{26}$），该蛋白为碱性亲水性不稳定蛋白。（2）系统进化树分析显示，*SmPAD*4 与刺苞菜蓟（*Cynara cardunculus*）*CcPAD4* 的氨基酸序列相似度最高。（3）扩增出 1 049 bp 的 *SmPAD*4 启动子序列，包含有光响应元件、低氧应答元件、干旱、生长素应答元件等顺式作用元件。（4）实时荧光定量分析显示，*SmPAD*4 基因在根、茎和叶中均有表达，且在叶中的表达量最高；在紫外和低氧胁迫下 *SmPAD*4 基因在叶和茎中表达量均上调，根中表达量下调。（5）亚细胞定位显示，*SmPAD*4 分布于细胞核、细胞膜和叶绿体。该研究表明，*SmPAD*4 基因拥有独特的蛋白结构域，并且响应低氧和紫外两种环境胁迫，在通气组织的形成以及对逆境胁迫的响应中具有重要作用，为进一步探究 *SmPAD*4 基因在水母雪兔子环境适应过程中的作用提供理论依据。

关键词：水母雪兔子，*SmPAD*4，通气组织，表达分析，低氧胁迫，紫外胁迫
中图分类号：Q943　　　　　　　　　**文献标识码**：A

Cloning and expression of aerenchyma-related gene *SmPAD*4 in *Saussurea medusa*

WEI Rongyi[1,2,3], DUAN Peng[4], LI Peilan[1,2,3], LUO Dan[1,2,3], SHI Guomin[2,3],
DAI Wubing[2,3], LI Fengzhen[1,2,3], HE Tao[1,2,3*]
(1. *School of Ecol-Environmental Engineering*, *Qinghai University*, Xining 810016, China; 2. *Key Laboratory of Landscape Plants of Qinghai Province*, Xining 810016, China; 3. *State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture*, *Qinghai University*, Xining 810016, China; 4. *Academy of Animal Science and Veterinary*, *Qinghai University*, Xining 810016, China)

Abstract: The aerenchyma is an adaptive structure of *Saussurea medusa* in response to extreme

收稿日期：2024-03-24
基金项目：国家自然科学基金（31960222）。
第一作者：韦鎔宜（1998-），硕士，主要从事植物分子生物技术研究，（E-mail）1435928499@ qq. com。
[*]**通信作者**：何涛，博士，教授，主要从事植物生物技术研究，（E-mail）hetaoxn@ aliyun. com。

environments, and its formation is usually accompanied by programmed cell death （PCD）. The death of cells and the formation of aerenchyma are typically regulated by the *PAD*4 gene（Phytoalexin deficient 4）. However, the mechanism by which *SmPAD*4 regulates the formation of aerenchyma in *S. medusa* remains unclear. In this study, *S. medusa* was used as the experimental material, and the gene *SmPAD*4 related to ventilation tissue formation was cloned by homologous cloning and RACE technology, and its sequence, phylogenetic evolution, expression and subcellular localization were analyzed, and its promoter was amplified by hi-1IL PCR technology to explore its function in environmental adaptation. The results were as follows:（1）The cDNA of *SmPAD*4 gene was successfully cloned with a total length of 2 047（GenBank accession number OR766038）, including an open reading frame of 1 866 bp, encoding 621 amino acids, a molecular formula of $C_{3163}H_{4906}N_{848}O_{910}S_{26}$. The protein was an alkaline and hydrophilic unstable protein. （2）Phylogenetic tree analysis showed that *SmPAD*4 had high similarity with *CcPAD*4 of *Cynara cardunculus*. （3）A 1 049 bp promoter sequence of *SmPAD*4 was amplified, which included cis-acting elements such as light response element, hypoxia response element, methyl jasmonate response element, dry early, auxin response element and binding site of WRKY transcription factor.（4）Real-time quantitative fluorescence analysis showed that *SmPAD*4 gene was expressed in roots, stems and leaves, and the expression level was the highest in leaves. Under ultraviolet and hypoxia stress, the expression of *SmPAD*4 gene was up-regulated in leaves and stems, and down-regulated in roots. （5）Subcellular localization showed that *SmPAD*4 is distributed in the nucleus, cell membrane, and chloroplast. The results show that *SmPAD*4 gene has a unique protein domain and it responds to hypoxia and ultraviolet environmental stress, so it plays an important role in the formation of aerenchyma and the response to adversity stress. This study provides theoretical basis for further exploring the role of *SmPAD*4 gene in the environmental adaptation process of *S. medusa*.

Key words: *Saussurea medusa*, *SmPAD*4 gene, aerenchyma, expression analysis, hypoxia stress, ultraviolet stress

水母雪兔子（*Saussurea medusa*）属菊科（Compositae）风毛菊属（*Saussurea* DC.），为多年生草本植物，主要分布于青藏高原地区（Pegadaraju et al., 2007；Dawa et al., 2009；Szechynska et al., 2016），其主要受高寒、低氧和强紫外辐射等极端环境的胁迫。根、茎和叶中发达的通气组织是水母雪兔子最具有代表性的结构特征，它是水母雪兔子应对极端环境的一种适应机制（王文和等，2007；蒋欣悦等，2023）。而 *PAD*4 基因在植物细胞程序性死亡和形成通气组织形成中起着重要作用（Bernacki et al., 2019；Bernacki et al., 2023），但目前水母雪兔子的非生物胁迫响应机制仍不明确。因此，研究水母雪兔子通气组织形成相关基因 *SmPAD*4，对揭示高山植物适应环境的特殊机制具有重要的理论意义。

*PAD*4 作为 R（resistance）基因介导的信号转导分子，是参与植物免疫应答、PCD 调控和通气组织形成的关键基因，在植物响应生物与非生物胁迫的过程中起到重要作用（Rietz et al., 2011；Zeng et al., 2021；支添添等，2022）。*PAD*4 响应各种非生物胁迫（如强光、紫外线辐射、干旱和寒冷等）主要通过次级信使介导，如水杨酸（SA）、活性氧（ROS）、乙烯（ET）和其他信号分子等，并且在拟南芥与木本植物中被证明参与调节植物细胞程序性死亡、细胞壁合成、种子产量、生物物质生成和水分利用（Feys et al., 2001；Ślesak et al., 2014；Cui et al., 2017）。已有大量研究表明，*PAD*4 与 *LSD*1（Lesion simulating disease 1）和 *EDS*I（Enhanced disease susceptibility 1）形成特定枢纽来调节植物细胞死亡和适应生物和非生物胁迫（Aviv et al., 2002；Mateo et al., 2004；Mühlenbock et al., 2007；Gao et al., 2010；Karpiński

et al., 2013；Wituszyńska et al., 2015）。在拟南芥中，*AtPAD*4 突变导致 SA、ET 和 ROS 稳态受损，从而中断适应反应和细胞死亡信号传导，并且在低氧条件下 *AtPAD*4 被 *AtLSD*1.1 负调控来参与乙烯途径的溶生型通气组织形成过程（Mühlenbock et al., 2007；Karpiński et al., 2013；Youssef et al., 2013；Bernacki et al., 2018）。在水稻中，朱静雯（2014）通过改变氮素含量来刺激水稻，使 *OsPAD*4 改变对氮素的响应模式，从而来调控细胞程序性死亡诱导通气组织形成。在葡萄中，*VvPAD*4 与 *VvEDS*1 形成稳定的分子复合物来适应非生物胁迫和调控细胞死亡（Gao et al., 2014；Tandon et al., 2015）。在大豆中，*GmPAD*4 是防御信号传导所必需，并且参与调控细胞死亡和生物胁迫应答过程（Wang et al., 2014；Pant et al., 2015）。目前，*PAD*4 基因对通气组织形成及其调控研究主要集中于拟南芥、水稻和烟草等植物（Bubici et al., 2006；Hanling et al., 2024），对 *PAD*4 基因在水母雪兔子逆境适应过程中的功能研究仍不明确。

为此，本研究以自然生长于青藏高原地区的水母雪兔子作为试验材料，通过分子生物学技术克隆与通气组织形成相关的基因 *SmPAD*4 及扩增其启动子，并研究该基因在紫外和低氧胁迫条件下的表达，从而分析基因与生态环境之间的关系，为水母雪兔子的分子适应机制和高山植物功能生态学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

取青藏高原东北部祁连山支脉（青海西宁，101°41′ E、37°36′ N）的水母雪兔子植株及种子进行相关实验。于开花期采集幼嫩叶片用于基因克隆和启动子扩增。

将采集的种子于实验室培养至长出两片真叶（约 70 d），然后参照师生波等（2006）和蒋欣悦等（2023）的方法对其进行紫外胁迫与低氧胁迫；并于胁迫处理 1、2、4、6、12 h 后取样，用于基因的组织表达分析。

1.2 *SmPAD*4 基因 cDNA 全长的克隆

从 NCBI 下载菊科植物刺苞菜蓟（*Cynara cardunculus*）、莴苣（*Lactuca sativa*）、向日葵（*Helianthus annuus*）和小蓬草（*Erigeron canadensis*）已上传的 *PAD*4 的 CDS 区域，利用 DNAMAN5.0 比对后设计简并引物（表 1）。

以野外采集的水母雪兔子叶片为实验材料，按照 MiniBest Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取水母雪兔子总 RNA，检测 RNA 质量合格后按照 Prime Script TMII1st strand cDNA synthesis Kit（TaKaRa）试剂盒反转 cDNA 第一链。根据简并引物扩增出的中间片段设计 2 个 3′-RACE 和 2 个 5′-RACE 的巢式 PCR 特异性引物（表 1），按照 SMARTer®RACE 5′/3′Kit 试剂盒进行 RACE 实验，并对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测，将符合大小条带回收并进行蓝白斑筛选，将阳性菌落挑出送生物公司测序。二轮巢式 PCR 扩增得到的序列与中间片段进行拼接得到水母雪兔子 *SmPAD*4 基因的 cDNA 全长，根据全长序列设计引物进行验证。

1.3 *SmPAD*4 基因的生物信息学分析

利用 Open Reading Frame Finder（ORF Finder）寻找开放阅读框和序列编码产物；通过 ProtParam 工具（http://web.expasy.org/protparam/）进行氨基酸序列等电点、分子量和不稳定系数等理化性质分析；用 Pfam（http://pfam.xfam.org/）进行保守结构域分析，通过 SOPMA（http://pbil.ibcp.fr）和 SWISS-MODEL 数据库（http: //swissmodel.expasy.org/）预测 *SmPAD*4 蛋白的二、三级结构；借助 NCBI Blastp 和 DNAMAN5.0 软件进行同源序列及序列比对；将同源性高的 *PAD*4 基因蛋白使用 MEGA11 构建水母雪兔子 *SmPAD*4 与其他植物的同源蛋白系统进化树；通过 WoLF PSORT（https://www.genscript.com/wolf-psor）对 *SmPAD*4 进行亚细胞定位预测。

1.4 *SmPAD*4 基因的表达分析

用野外采取的水母雪兔子组织（根、茎、叶）为实验材料，提取 RNA 反转成 cDNA 为模板，进行野外环境下的组织表达分析。以实验室培养的水母雪兔子实生苗为实验材料进行紫外、低氧 2 种胁迫，于处理 1、2、4、6、12 h 采集水母雪兔子不同组织（根、茎、叶）提取 cDNA 进行环境胁迫的组织表达分析。本实验参照郭佳磊等（2020）和蒋欣悦等（2023）的方法以 *UPL*7 作为内参基因，设计荧光定量引物（表 2），每组处理进行三个生物学重复，按照 SYBR Premix Ex Taq II说明书流程进行 qRT-PCR。反应程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s（40 个循环）。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算水母雪兔子 *SmPAD*4 基因在根、茎和叶中的表达量，并使用 SPSS 26、Excel 2021 和 Origin 2021 进行分析与制图。

1.5 *SmPAD*4 启动子扩增

依据已克隆出的 *SmPAD*4 基因组序列设计三个巢式下游特异性引物（表 1）。按照 Mini BEST 通用型 DNA 提取试剂盒提取高浓度的水母雪兔子 DNA。采用 hi-1IL PCR（LIU et al., 2007；郭佳磊等，2020）的方法扩增 *SmPAD*4 启动子序列。分别进行预扩增、第一轮扩增和第二轮扩增 PCR 反应。扩增的启动子序列采用 PlantCREA（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html）在线预测顺式作用元件。

1.6 *SmPAD*4 基因的亚细胞定位

通过 Primer Premier 5 寻找 *SmPAD*4 基因中带有 Sac I和 Xba I的双酶切位点，然后加入 5′和 3′接头引物合成 PAD4-2300F 和 PAD4-2300R 引物（表 1）。通过 PCR 扩增该基因的 CDS 区，对 PCR 产物和 pCAMBIA2300-GFP 载体进行双酶切。使用同源重组方法用 T4DNA 连接酶构建融合表达载体 PAD4-2300。通过热激法将其转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞并筛选出阳性克隆，挑取阳性菌落进行菌落 PCR 检测。通过液氮冻融法将重组质粒转化农杆菌 GV3101，然后侵染本氏烟草叶片进行瞬时表达，培养 2~3 d 后，使用含 2300-GFP 空载体的农杆菌作为对照，利用 FV10-ASW 激光共聚焦显微镜观察叶片中的荧光信号。

表 1 实验用引物

Table1 Primer sequences used in this study

类型 Type	引物名称 Primer name	引物序列 (5′→3′) Primer sequence (5′→3′)
cDNA 扩增 cDNA amplification	PAD4-F	TTTGTRCCRTTTGGGAAYTTYATGTTTTG
	PAD4-R	CCCAYTTGGCTCGYTTRTGRAARTC
	5-PAD4-1	CCACTTGGCTCGCTTGTGGAAG
	5-PAD4-2	GCCGAGTTGGTCGTCGGATTT
	3-PAD4-1	TCAGGGTCTCCGAGTTCTAGCATTG
	3-PAD4-2	TGTGACAAATCCGACGACCAACTC
	cDNA-F1	GCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG
	cDNA-R1	CAGATTCTATATCTTATATCG
	cDNA-F2	AATCAATCTCATCTCCTCCTACTG
	cDNA-R3	TCCTCTTATTACGGTGCCACTTTC
启动子扩增 Promoter amplification	P-PAD4-R1	ATCCCTCCGTCAACCAATGAAACTCC
	P-PAD4-R2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCC ACCCTGAGTCGCCATGACATTTGATC
	P-PAD4-R3	GATTCCATGACTCCAGCAGAAGTGGC
qRT-PCR	Q-PAD4F	GATCCGTTGTGTGGGAATTTG

	Q-PAD4R	CATCCACCATCGCTGTATTCT
	Q-UPL7F	GCAGTCACTTTGGCACTTCG
	Q-UPL7R	GCCTGAAGCAAGGCGTTAAG
亚细胞定位 Subcellular localization	PAD4-2300F	AGAACACGGGGGACGAGCTCATGGGGGAGACTAGTGAGATGC
	PAD4-2300R	ACCATGGTGTCGACTCTAGACGGTGCCACTTTCCGATCCAA

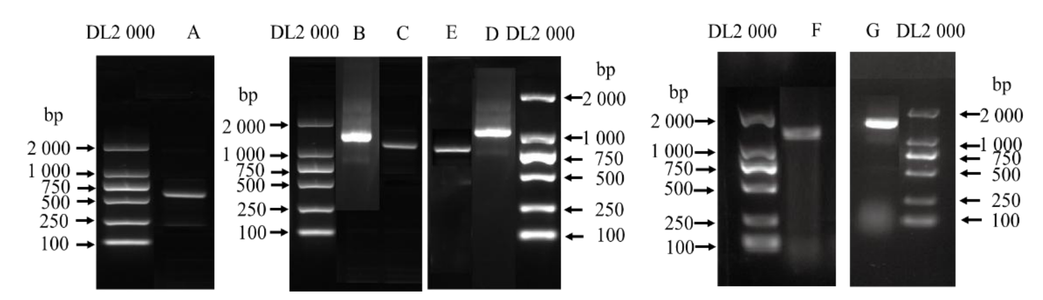
注：R 为 A 或 G，Y 为 C 或 T。

Note: R is A or G, Y is C or T.

2 结果与分析

2.1 *SmPAD*4 基因 cDNA 全长的克隆

首先通过 RT-PCR 扩增出 574 bp 的保守片段，3′ RACE 和 5′ RACE 反应分别扩增出 1 150 bp 和 1 359 bp 的片段（图 1）。该基因 cDNA 全长 2 047 bp（GenBank 登录号 OR766038），其中包括 1 866 bp 的开放阅读框，编码 621 个氨基酸，并进行了 cDNA 全长验证。



A. 保守片段；**B**，**C**. 巢式 PCR5′-RACE；**D**，**E**. 巢式 PCR3′-RACE; **F**，**G**. cDNA。

A. Conservative region; **B**, **C**. Nested PCR5′-RACE; **D**, **E**. Nested PCR3'-RACE; **F**, **G**. cDNA.

图 1 *SmPAD*4 基因的克隆

Fig. 1 Cloning gene of *SmPAD*4

2.2 *SmPAD*4 基因的生物信息学分析

*SmPAD*4 基因共编码 621 个氨基酸，分子式为 $C_{3163}H_{4906}N_{848}O_{910}S_{26}$，分子量为 70.22 kDa，等电点为 8.18，蛋白脂肪指数为 87.13，无信号肽，总平均亲水系数为-0.194，不稳定系数为 40.48，为碱性亲水性不稳定蛋白。跨膜结构预测结果显示有跨膜区域，说明 *SmPAD*4 蛋白属于跨膜蛋白。将水母雪兔子 *SmPAD*4 基因预测的编码氨基酸序列，通过 Neighbor-Joining 法构建 *SmPAD*4 和其他物种 *PAD*4 蛋白的系统进化树（图 2）发现，水母雪兔子 *SmPDA*4 和刺苞菜蓟（XP_024962884.1、XP_024962885.1）、莴苣（XP_023737098.1）、小蓬草（XP_043623496.1）、向日葵（XP_021989681.1）等 *PAD*4 蛋白亲缘关系较近，其中进化距离最近的是刺苞菜蓟（XP_024962884.1、XP_024962885.1）。蛋白多序列比对（图 3）显示水母雪兔子 *PAD*4 与刺苞菜蓟相似度最高。将 *SmPAD*4 与菊科其他植物进行核苷酸和氨基酸序列比较发现，与刺苞菜蓟的核苷酸序列相似度高达 87.16%，与其他菊科的核苷酸序列相似度达 74%以上；与刺苞菜蓟的氨基酸序列相似度高达 87.66%，与其他菊科的核苷酸序列相似度达 73%以上。对 *SmPAD*4 进行亚细胞定位预测可知其定位在细胞核、叶绿体和细胞膜中。

*SmPAD*4 含有多个磷酸化位点（图 4：A），其中丝氨酸磷酸化位点最多且多个位点预测值在 0.9 以上，表明 *SmPAD*4 蛋白可受磷酸化作用调控。其蛋白质二级结构（图 4：B）预测显示，该序列主要含有α-螺、延伸链、β-折叠和无规卷曲。其中，α-螺旋有 314 个氨基

酸，占 50.56%；延伸链有 51 个氨基酸，占 8.21%；β-折叠有 18 个氨基酸，占 2.9%；无规卷曲有 238 个氨基酸，占 38.33%。α-螺旋、延伸链和无规卷曲贯穿于整个氨基酸链，β-折叠只有一点点，散布在α-螺旋附近。利用 SWISS-MODEL 对 *SmPAD*4 蛋白三级结构的预测见图 4：C。并且该蛋白 N 端具有保守性较高的α/β水解酶折叠结构域，在菊科植物的进化过程中具有高度的保守性。C 端包含 *EDS*1-*PAD*4（EP）结构域，是稳定异二聚化所必需的，包括了类脂酶蛋白家族（*EDS*1，*PAD*4，*SAG*101），这组蛋白质可参与细胞表面和细胞内免疫受体的信号传导，因此 *PAD*4 具有特定的结构域功能。

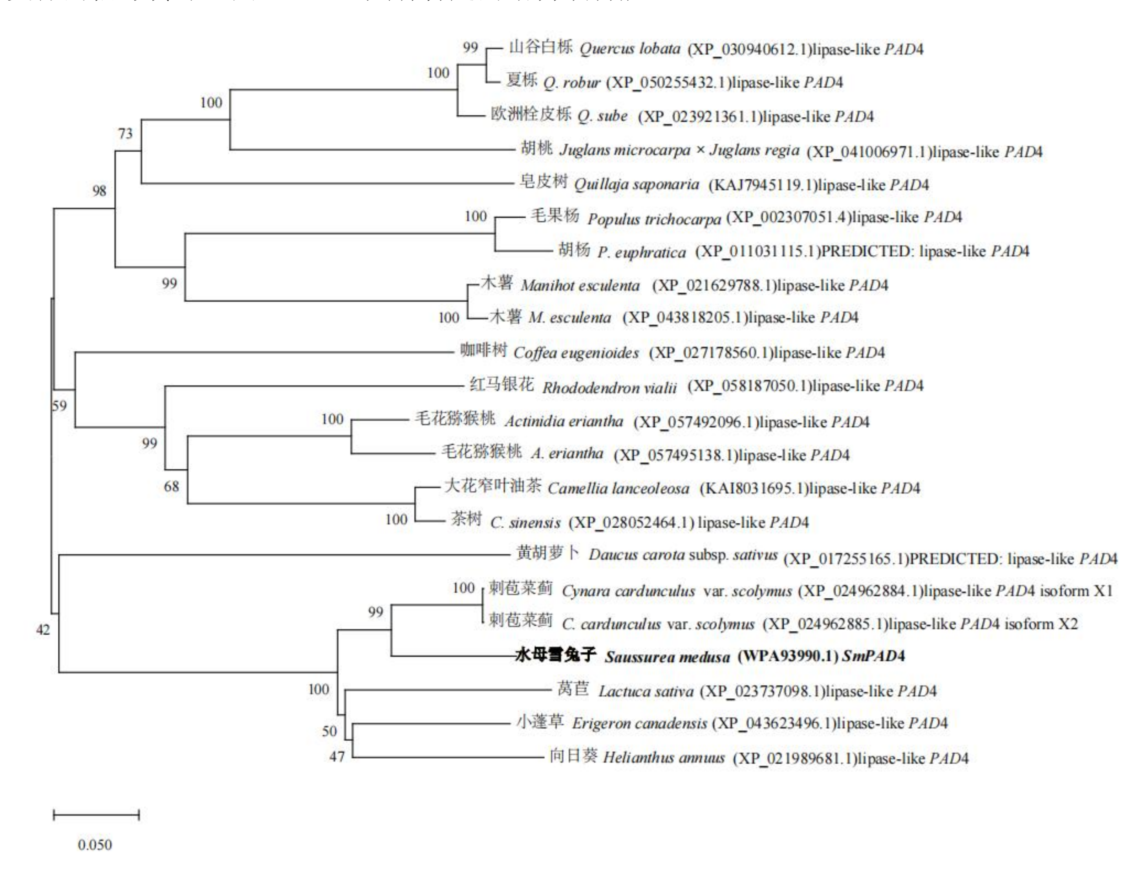
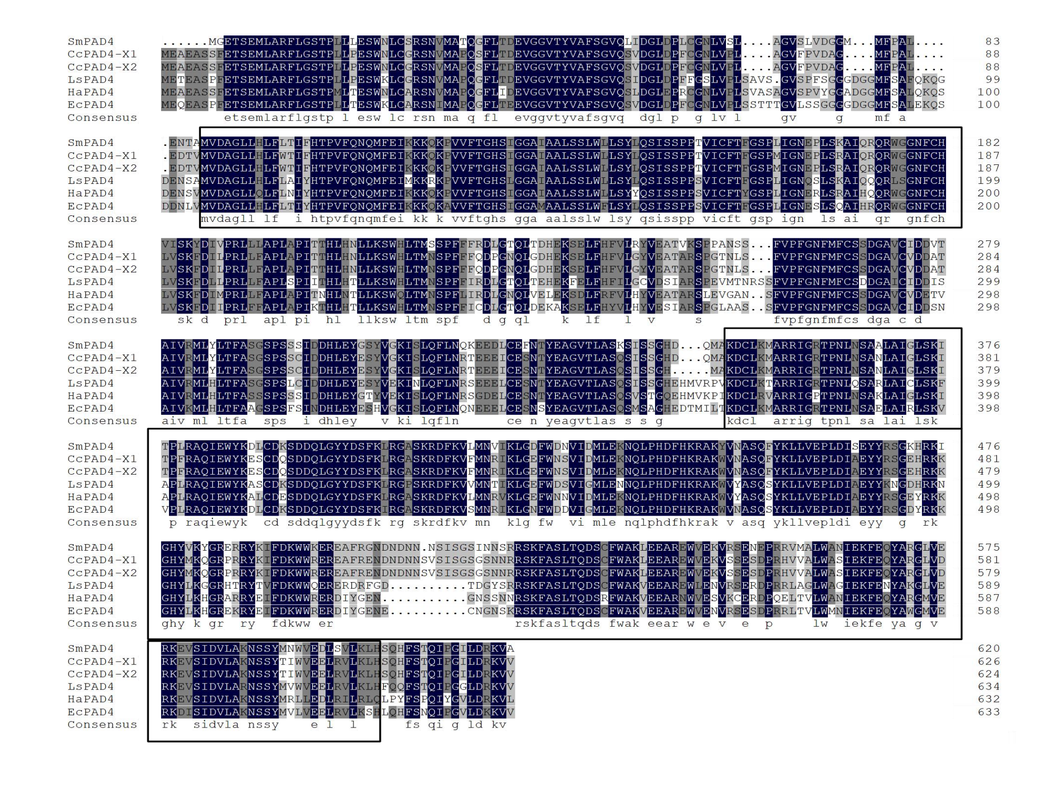


图 2 不同物种 *PAD*4 蛋白的进化关系分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PAD*4 proteins from various species

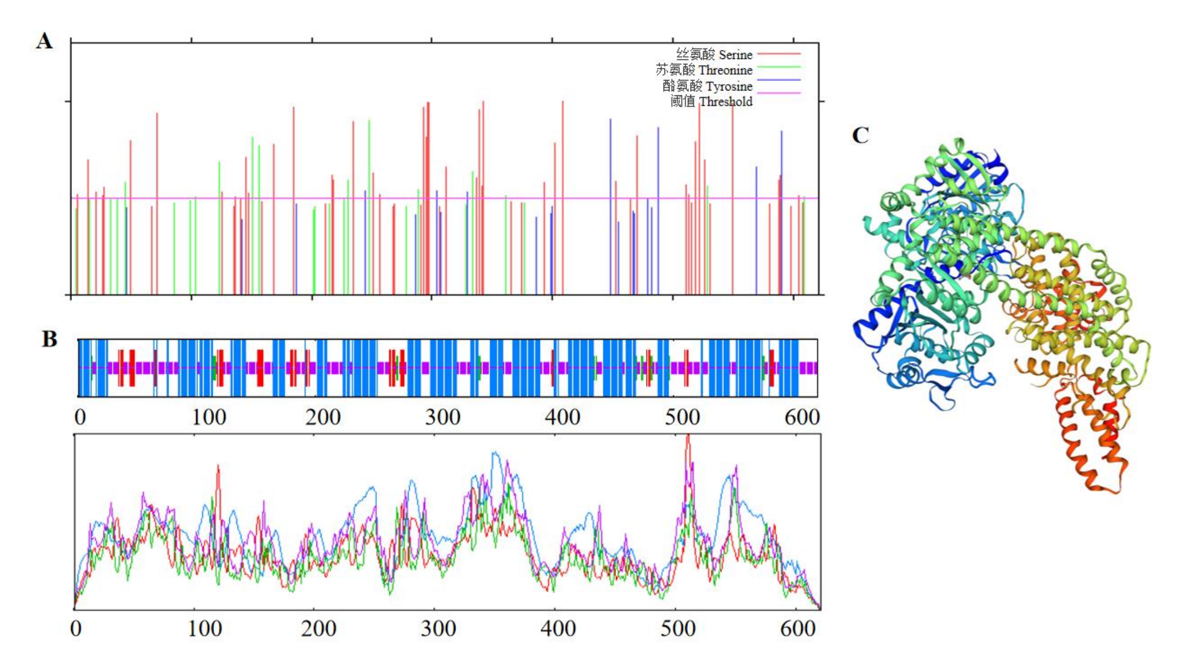


SmPAD*4**. 水母雪兔子（WPA93990.1）；CcPAD*4-X1**. 刺苞菜蓟（XP_024962884.1）；***CcPAD*4-X2**. 刺苞菜蓟（XP_024962885.1）；***LsPAD*4**. 莴苣（XP_023737098.1）；***HaPAD*4**. 向日葵 （XP_021989681.1）；***EcPAD*4**. 小蓬草（XP_043623496.1）；方框显示α/β水解酶折叠的结构域与 *EDS*1-*PAD*4（EP）结构域。

***SmPAD*4**. *Saussurea medusa* (WPA93990.1); ***CcPAD*4-X1**. *Cynara cardunculus* (XP_024962884.1); ***CcPAD*4-X2**. *Cynara cardunculus* (XP_024962885.1); ***LsPAD*4**. *Lactuca sativa* (XP_023737098.1); ***HaPAD*4**. *Helianthus annuus* (XP_021989681.1); ***EcPAD*4**. *Erigeron canadensis* (XP_043623496.1); Box shows the α/β hydrolase folded domain with the *EDS*1-*PAD*4 (EP) domain.

图 3 菊科 *PAD*4 蛋白多序列比对

Fig. 3 Protein multiple sequence alignment of *PAD*4 in Asteraceae



A. *SmPAD*4 蛋白磷酸化位点；**B**. *SmPAD*4 蛋白二级结构预测 **蓝色**. α 螺旋；**红色**. 延伸链；**绿色**. β 折叠；**紫色**. 无规卷曲；**C**. *SmPAD*4 蛋白三级结构预测。

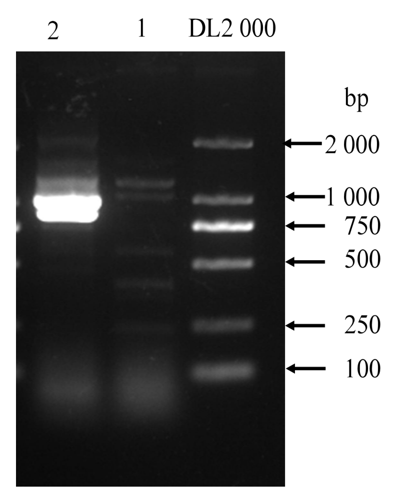
A. Phosphorylation sites of *SmPAD*4 protein; **B**. *SmPAD*4 secondary structure prediction **Blue**. Alpha helix; **Red**. Extended strand; **Green**. Beta turn; **Purple**. Random coil; **C**. *SmPAD*4 tertiary structure prediction.

图 4 *SmPAD*4 普通生物信息学分析

Fig. 4 General bioinformatics analysis of *SmPAD*4

2.3 *SmPAD*4 基因的启动子扩增

通过 hiTAIL-PCR 的方法扩增出 1 049 bp 的 *SmPAD*4 启动子序列（图 5）。通过 PlantCREA 在线预测发现该启动子区域除大量的 TATA-box 和 CTAA-box 启动子顺式元件外还包含有光响应元件（Box 4 和 GT1-motif）、低氧应答元件（ARE）、茉莉酸应答元件（CGTCA-motif 和 TGACG-motif）、干旱（MBS）和生长素应答元件（AuxRR-core）等顺式作用元件（表 2）。说明 *SmPAD*4 基因可参与光信号、低氧、干旱和 MeJA（茉莉酸甲酯）和 WRKY 转录因子的结合位点（W-box）等信号胁迫诱导的调控机制，因此推测 *SmPAD*4 在水母雪兔子生长发育过程中参与相关的调控及生理过程。



1. 启动子一轮扩增；**2**. 启动子二轮扩增。

1. First amplification of promoter; **2**. Second amplification of promoter.

图 5 *SmPAD*4 基因的启动子扩增

Fig.5　Promoter amplification of *SmPAD*4 gene

表 2 *SmPAD*4 启动子中的顺式元件

Table 2　*Cis*-acting element in the *SmPAD*4 promoter

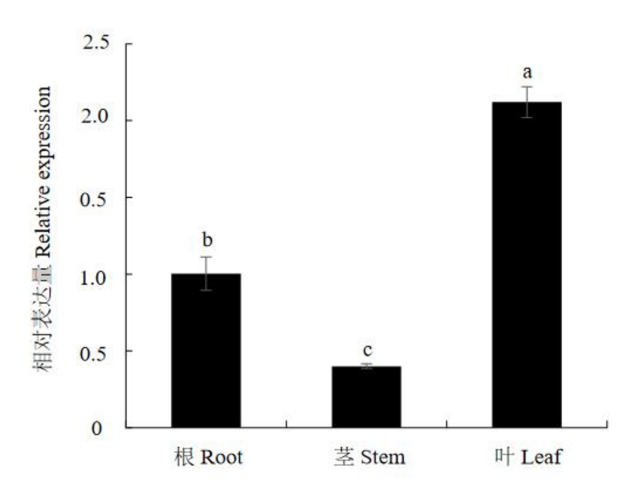
元件 Element	功能 Function	位置 Position	序列 Sequence
Box 4	部分光响答保守 DNA 组件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	164（+）、805（-）	ATTAAT
GT1-motif	部分光响应元件 DNA 组件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	275（-）	GGTTAA
ARE	低氧诱导必需的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	285（-）	AAACCA
AuxRR-core	生长素反应的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element involved in auxin responsiveness	409（+）	GGTCCAT
CGTCA-motif	MeJA 反应的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	495（-）、751（+）、 1 037（-）	CGTCA
CCAAT-box	MYBHv 1 结合位点 MYBHv1 binding site	993（-）	CAACGG
MBS	干旱诱导 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility	491（-）	CAACTG
O2-site	玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation	73（+）	GATGATGTGG
TGACG-motif	MeJA 反应的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	495（+）、751（-）、 1 037（+）	TGACG
CAT-box	分生组织相关的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element related to meristem expression	860（+）	GCCACT
W-box	WRKY 转录因子的结合位点 Binding site of WRKY transcription factor	766（-）、853（-）	TTGACC

2.4 *SmPAD*4 基因的组织表达

组织表达结果表明，*SmPAD*4 基因在野生水母雪兔子根、茎、叶中均有表达（图 6），表达量由高到低依次为叶>根>茎，其中叶的表达量约为茎的 5.3 倍，根的表达量约为茎的 2.5 倍，均差异显著（$P<0.05$）。

紫外胁迫条件下（图 7：A），*SmPAD*4 基因在根中的表达量均低于对照，处理 4 h 时达到最低峰值；茎中表达量呈先升高后降低的趋势，处理 6 h 时达到最高峰值；叶表达量呈先升高后降低的趋势，处理 4 h 时达到最高峰值。低氧胁迫条件下（图 7：B），根中的表达量均低于对照，处理 6 h 时达到最低峰值；茎中表达量呈上下反复波动趋势，处理时间表达量均高于对照表达量，处理 12 h 时达到最高峰值；叶中表达量呈先上升后下降趋势，处理 4 h 时达到最高峰值。

根据 Lorbiecke 和 Bailey-Serres（1999）与孔妤等（2008）研究可知，在缺氧情况下 1~3 h 内乙烯积累促进生成通气组织，并且在胁迫时间达到 12 h 时基因响应胁迫产生的表达水平具有显著差异（Bailey-Serres & Voesenek, 2008）。因此，本研究对水母雪兔子实生苗分别进行了 4 h 和 12 h 的紫外胁迫和低氧胁迫处理，并对 *SmPAD*4 在水母雪兔子根茎叶中的表达进行分析。结果表明，胁迫 4 h 时，紫外和低氧胁迫的响应均能显著影响水母雪兔子各组织中 *SmPAD*4 表达量（图 8：A），在根中，紫外胁迫和低氧胁迫显著降低了 *SmPAD*4 相对表达量（$P<0.05$），其中紫外胁迫下 *SmPAD*4 的表达量最低；在茎中，紫外胁迫和低氧胁迫显著提高了 *SmPAD*4 相对表达量（$P<0.05$），其中低氧胁迫下 *SmPAD4* 的表达量最高；在叶中，紫外胁迫和低氧胁迫显著提高了 *SmPAD*4 相对表达量（$P<0.05$），其中紫外胁迫下 *SmPAD*4 的表达量最高。胁迫 12 h 时，紫外和低氧胁迫的响应均能显著影响水母雪兔子各组织中 *SmPAD*4 表达量（图 8：B），在根中，紫外胁迫和低氧胁迫显著降低了 *SmPAD*4 相对表达量（$P<0.05$），其中紫外胁迫下 *PAD*4 的表达量最低；在茎和叶中，紫外胁迫和低氧胁迫显著提高了 *SmPAD*4 相对表达量（$P<0.05$），其中低氧胁迫下 *SmPAD*4 的表达量最高（$P<0.05$）。

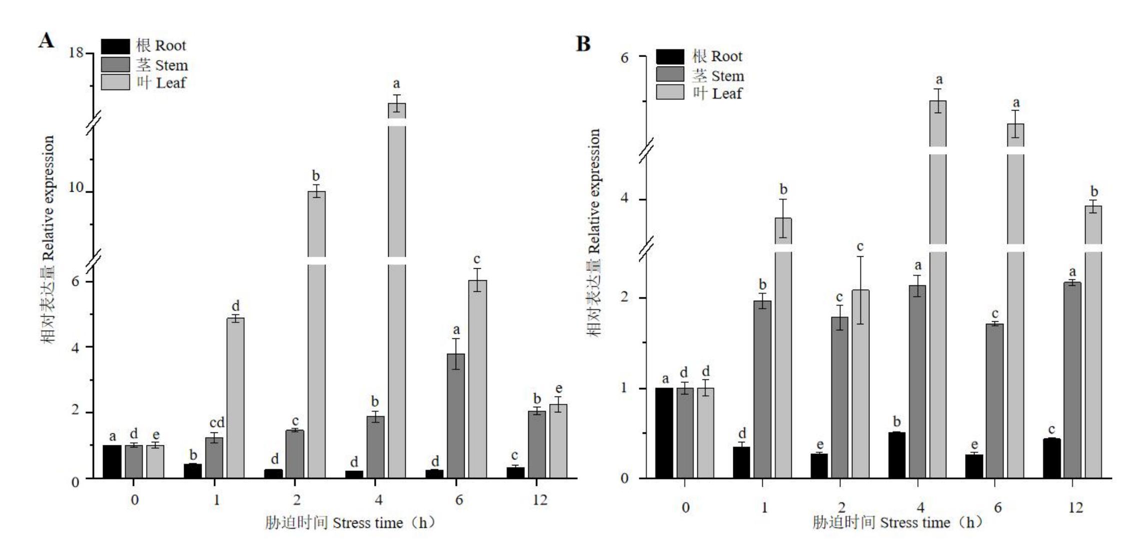


不同小写字母表示在 0.05 水平显著性差异。同下。

Different small letters cindicate significant differences at 0.05 level. The same below.

图 6 不同组织中 *SmPAD*4 基因表达水平

Fig. 6 Expression level of *SmPAD*4 in different tissues

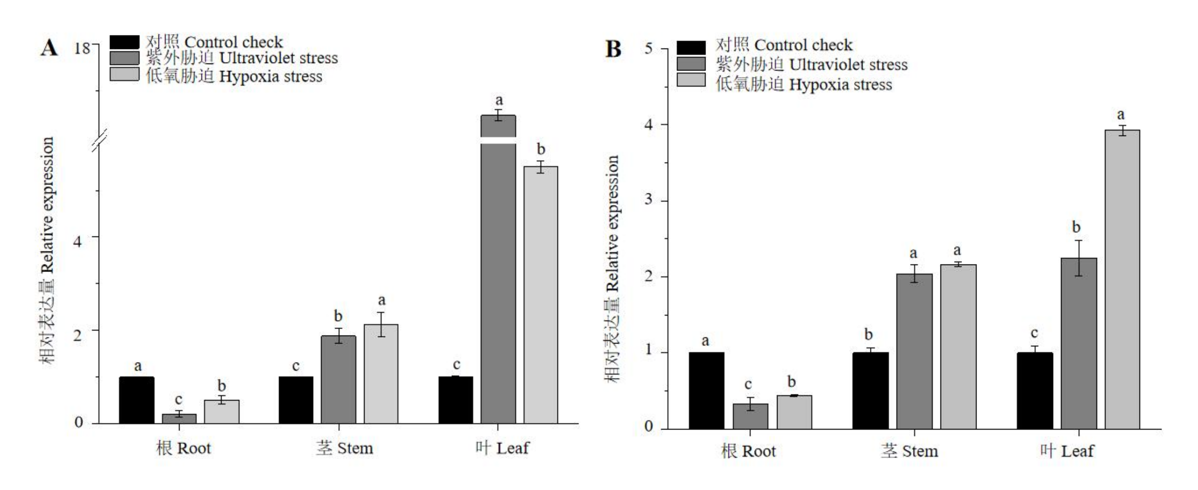


A．紫外胁迫处理；**B**．低氧胁迫处理。

A. Ultraviolet stress treatment; **B**. Hypoxia stress treatment.

图 7 不同胁迫下 *SmPAD*4 基因在根、茎和叶的表达量

Fig. 7　Expression of *SmPAD*4 gene in roots, stems and leaves under different stresses



A．4 h 处理；**B**．12 h 处理。

A. 4 h treatment; **B**. 12 h treatment.

图 8 胁迫 4 h 和 12 h 后 *SmPAD*4 基因在各组织的表达量

Fig. 8　Expression of *SmPAD*4 gene in different tissues after 4 h and 12 h stress

2.5 *SmPAD*4 基因的亚细胞定位

亚细胞定位结果（图 9）显示,含有目标基因的 PAD4-2300 融合蛋白绿色荧光信号主要分布于细胞膜和细胞核，部分分布于叶绿体中，表明 *SmPAD*4 蛋白主要在细胞膜、细胞核和叶绿体中发挥功能。

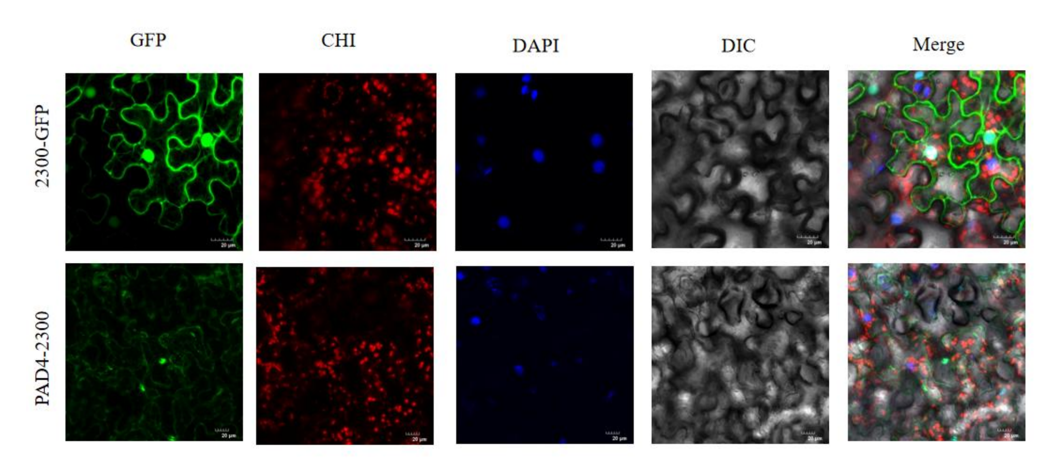


图 9 PAD4-2300 融合蛋白在烟草表皮细胞中的亚细胞定位

Fig.9 Subcellular localization of PAD4-2300 fusion protein in *Nicotiana benthamian* epidermal cells

3 讨论与结论

*PAD*4 是调控植物响应生物与非生物胁迫和 PCD 的关键基因，在植物生长发育中有着重要作用（Wituszynska et al., 2013）。本研究从水母雪兔子中克隆出 2 047 bp 的 *SmPAD*4 基因，包含 1 866 bp 的 CDS 区，编码 621 个氨基酸。对 *SmPAD*4 进行蛋白分析，其蛋白脂肪指数为 87.13，为碱性亲水性不稳定蛋白，属于水解酶超家族蛋白。*SmPAD*4 蛋白含有多个磷酸化位点，表明其可受磷酸化作用调控。通过结构域预测，发现 *SmPAD*4 基因 N 端有α/β水解酶结构域，在菊科植物的进化过程中具有高度的保守性，C 端包含着 EP 结构域，可以形成稳定的异二聚化结构。*PAD*4 与同属于水解酶家族的 *EDS*1 的 N 端都有与酰基水解酶同源的结构域，使两者可为互作蛋白来响应逆境胁迫（Wiermer et al., 2005）。种子植物中，*PAD*4 和 *EDS*1 因具有同源结构域特征能够形成异源二聚体，从而介导植物的细胞死亡和免疫反应（Lapin et al., 2019；Lapin et al., 2020）。在被子植物的研究中，沉默 *PAD*4 基因 N 端的稳定复合物并进行共表达，结果表明 *PAD*4 响应干旱、脱落酸处理以及生物胁迫处理（Baggs et al., 2020）。在拟南芥中，通过表达 *PAD*4 基因的 N 端脂肪酶样结构域（LLD），不表达其 C 端 EP 结构域，发现 *PAD*4 可以作为二分蛋白发挥作用，说明 LLD 和 EP 结构域在植物防御中发挥独特且可分离的作用（Dongus et al., 2020）。*SmPAD*4 独特的结构域使其可作为二分蛋白来响应水解代谢和免疫信号，进一步参与调控植物的生物及非生物胁迫。

在植物中，大多数含 TATA-box 的启动子主要参与组织特异性表达和胁迫反应，并且已知 AP2 / ERF、bZIP、NAC、MYB 和 WRKY 是常见的参与病原体防御的启动子元件（Singh et al., 2002；Gutterson & Reuber, 2004；Molina & Grotewold, 2005；Civáň & Švec, 2009；Ng et al., 2018）。本研究发现 *SmPAD*4 启动子区域除大量的 TATA-box 和 CTAA-box 启动子顺式元件外还包含有光响应元件（Box 4 和 GT1-motif）、低氧应答元件（ARE）、茉莉酸甲酯应答元件（CGTCA-motif 和 TGACG-motif）、干旱（MBS）、生长素应答元件（AuxRR-core）和 WRKY 转录因子结合位点（W-box）等顺式作用元件。在雪莲 *SikCDPK*1 基因和玉米 *GRAS* 基因家族启动子的研究中均包含了光信号、低氧、干旱、生长素和 MeJA 相关的顺式元件从而参与植物的生长发育和调控生物与非生物胁迫响应（史光珍等，2022；吴占清等，2024），与本研究结果一致。说明了 *SmPAD*4 基因可响应多种胁迫信号，来保障其在植物生长发育，进一步说明 *SmPAD*4 参与调控水母雪兔子的生长发育和应答生物与非生物胁迫，在水母雪兔子适应极端环境中起到重要作用。

蛋白质在植物细胞内的定位分布是了解其分子功能、基因调控和蛋白质-蛋白质相互作

用的关键（未丽和刘建利，2021）。本研究通过侵染本氏烟草对 *SmPAD*4 基因进行了亚细胞定位，结果显示 *SmPAD*4 定位于细胞膜、细胞核和叶绿体中，这与植物响应生物与非生物胁迫时产生的蛋白质传导信号 *EDS*1-*PAD*4 复合物通常出现于细胞核中的结果一致（García et al., 2010；Gao et al., 2020）。在拟南芥中 *AtPAD*4 定位于细胞质和细胞核中（Czarnocka et al., 2017），产生防御信号转导促进细胞程序性死亡。在小麦中（Song et al., 2022），*TaPAD*4 同拟南芥一样定位于细胞质和细胞核中来参与植物免疫。本研究发现 *SmPAD*4 不止定位于细胞膜和细胞核中还定位于叶绿体中，可能因为叶绿体是光响应场所，而 *PAD*4 在光响应的过量激发能量（excess excitation energy，EEE）中作为乙烯和 ROS 生产的上游来调节程序性细胞死亡、光驯化和整体防御反应的信号传导，同时 *PAD*4 可转导光氧化应激信号，导致细胞死亡和植物生长缓慢，以及参与植物适应性调节（Mühlenbock et al., 2008；Neubauer et al., 2020）。并且 *PAD*4 被认为是典型的 NLR 信号成分，可在细胞质、细胞核、质膜、液泡膜和内质网等亚细胞结构中发挥功能，对乙烯、活性氧产生、胼胝质积累及植保素基因表达起到诱导及抑制作用（Chiang & Coaker, 2015；Pruitt et al., 2021；刘艳艳等，2023；Wang et al., 2024）。因此 *SmPAD*4 的亚细胞定位结果进一步确定了其可响应生物或非生物胁迫产生的乙烯、活性氧、水杨酸和脱落酸等信号来维持植物的正常生长。

水母雪兔子作为典型的高山植物，其生境具有强紫外辐射和缺氧等特征。为探究 *SmPAD*4 对其生境胁迫的响应，本研究对水母雪兔子进行了紫外和低氧胁迫，并对 *SmPAD*4 在其根、茎和叶中的相对表达量进行分析。qRT-PCR 结果表明，紫外和低氧胁迫下，*SmPAD*4 基因在根中的表达量始终低于对照；在茎和叶中的表达量始终高于对照。拟南芥受到紫外胁迫时，*AtPDA*4 上调来调控 PCD（Bernacki et al., 2021），与本研究结果一致。在低氧胁迫研究中发现玉米、小麦和黄瓜的 *PAD*4 基因参与调控细胞程序性死亡（Rajil et al., 2011; Yamauchi et al., 2014; Qi et al., 2019）。在水稻通气组织相关基因研究中发现，低氧处理后会下调 *OsPAD* 在根系中的表达而调控细胞程序性死亡（朱静雯，2014），这与本研究中低氧胁迫下 *SmPAD*4 基因在植物根中的表达情况一致。这可能是因为在缺氧的环境下，通过乙烯和生长素诱导 ROS 响应，使 *PAD*4 等相关基因协作后产生应答造成程序性细胞死亡从而形成通气组织（Yamauchi et al., 2014; Qi et al., 2019）。在对水母雪兔子 *SmLSD*1 的研究中发现，在紫外与低氧胁迫下 *SmLSD*1 于叶和茎中表达量下调，在根中表达量上调（蒋欣悦等，2023），而本研究中 *SmPAD*4 的表达量变化与 *SmLSD1* 相反。研究发现拟南芥中的 *AtPDA*4 被 *AtLSD*1 负调控来影响 PCD（Bernacki et al., 2021），说明在环境胁迫中 *SmPAD*4 与 *SmLSD*1 均响应并做出了应答且 *SmPAD4* 在低氧和紫外胁迫下受 *SmLSD*1 负调控来适应极端环境。这与拟南芥中 *AtPAD* 被 *AtLSD*1.1 负调控后参与乙烯途径来诱导植物通气组织的形成结果一致（Mühlenbock et al., 2007），推测 *SmPAD*4 基因在水母雪兔子不同组织中存在着不同的表达模式来响应逆境胁迫。在紫外和低氧胁迫 4 h 后，*SmPAD*4 表达量在各组织中显著变化，而 *SmPAD*4 在根和叶中的相对表达量变化高于低氧胁迫；进行 12h 胁迫后，*SmPAD*4 在紫外胁迫后根中的表达量变化高于低氧胁迫，说明 *SmPAD4* 基因在紫外胁迫下的表达量改变较显著。这可能因为 *PAD*4 可转导光氧化应激信号和乙烯与 ROS 生成的上游信号来调控植物的程序性细胞死亡（Mühlenbocket al., 2008；Petrov et al., 2015；Neubauer et al., 2020；Witoń et al., 2021）。本研究表明在两种胁迫下，*SmPAD*4 基因在水母雪兔子各组织中均能发生响应，在根中起负响应，在叶和茎中起正响应，这与拟南芥中 *AtPAD* 被 *AtLSD*1.1 负调控后参与乙烯途径来影响植物通气组织的形成结果一致（Mühlenbock et al., 2007），推测逆境胁迫下 *SmPAD*4 基因在水母雪兔子不同组织中存在着不同的表达模式。尽管水母雪兔子 *SmPAD*4 基因对低氧和紫外辐射均能做出应答反应，但其通气组织是由低氧引起，还是与紫外辐射有关，还是高山各种环境因子综合影响的结果，目前还不清楚，还需要更多的研究来证明。

参考文献:

AVIV DH, CHRISTINE RUSTÉRUCCI, HOLT BF, et al., 2002. Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd*1 is SA- and NIM1/NPR1-dependent[J]. Plant J, 29: 381-391.

BUBICI C, PAPA S, DEAN K, et al., 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance[J]. Oncogene, 25(51): 6731-6748.

BAILEY-SERRES J, VOESENEK LA, 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity[J]. Annu Rev Plant Biol, 59: 313-39.

BERNACKI, MACIEJ, JERZY, et al., 2018. *Enhanced disease susceptibility*1 (*EDS*1) affects development, photosynthesis, and hormonal homeostasis in hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides*) [J]. J Plant Physiol, 226: 91-102.

BERNACKI MJ, CZARNOCKA W, RUSACZONEK A, et al., 2019. *LSD*1-, *EDS*1- and *PAD*4-dependent conditional correlation among salicylic acid, hydrogen peroxide, water use efficiency and seed yield in *Arabidopsis thaliana*[J]. Physiol Plant, 165(2): 369-382.

BAGGS EL, MONROE JG, THANKI AS, et al., 2020. Convergent loss of an *EDS*1/*PAD*4 signaling pathway in several plant lineages reveals coevolved components of plant immunity and drought response[J]. Plant Cell, 32(7): 2158-2177.

BERNACKI MJ, RUSACZONEK A, CZARNOCKA W, et al., 2021. Salicylic acid accumulation controlled by *LSD*1 is essential in triggering cell death in response to abiotic stress[J]. Cells, 10(4): 962.

BERNACKI MJ, MIELECKI J, ANTCZAK A, et al., 2023. Biotechnological potential of the stress response and plant cell death regulators proteins in the biofuel industry [J]. Cells, 12(16): 2018.

CIVÁŇ P, ŠVEC M. 2009. Genome-wide analysis of rice (*Oryza sativa* L. subsp. japonica) TATA box and Y patch promoter elements[J]. Genome, 52(3): 294-297.

CHIANG YH, COAKER G, 2015. Effector triggered immunity: NLR immune perception and downstream defense responses[J]. Arabidopsis Book, 13: e0183.

CUI H, GOBBATO E, KRACHER B, et al., 2017. A core function of *EDS*1 with *PAD*4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity[J]. New Phytol, 213:1802–1817.

CZARNOCKA W, VAN DER KELEN K, WILLEMS P, et al., 2017. The dual role of Lesion simulating disease 1 as a condition-dependent scaffold protein and transcription regulator: insight into the *LSD*1 molecular function[J]. Plant Cell Environ, 40: 2644-2662.

DAWA ZM, BAI Y, ZHOU Y, et al., 2009. Chemical constituents of the whole plants of *Saussurea medusa*[J]. J Nat Med, 63: 327-330.

DONGUS JA, BHANDARI DD, PATEL M, et al., 2020. The *Arabidopsis PAD4* lipase-like domain is sufficient for resistance to green peach aphid[J]. Mol Plant Microbe Interaction, 33(2): 328-335.

FEYS BJ, MOISAN LJ, NEWMAN MA, et al., 2001. Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, *EDS*1 and *PAD*4[J]. EMBO J, 20: 5400-5411.

GUTTERSON N, REUBER TL, 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors[J]. Curr Opin Plant Biol, 7: 465-471.

GAO F, SHU X, ALI MB, et al., 2010. A functional *EDS*1 ortholog is differentially regulated in powdery mildew resistant and susceptible grapevines and complements an *Arabidopsis eds*1

mutant[J]. Planta, 231: 1037-1047.

GARCÍA, ANA V, BLANVILLAIN-BAUFUMÉ, et al., 2010. Balanced nuclear and cytoplasmic activities of *EDS*1 are required for a complete plant innate immune response[J]. Plos Pathog, 6(7): e1000970.

GAO F, DAI R, PIKE SM, et al., 2014. Functions of *EDS*1-like and *PAD*4 genes in grapevine defenses against powdery mildew[J]. Plant Mol Biol, 86: 381-393.

GAO C, WANG M, DING L, et al., 2020. High water uptake ability was associated with root aerenchyma formation in rice: Evidence from local ammonium supply under osmotic stress conditions[J]. Plant Physiol Biochem, 150: 171-179.

GUO JL, WANG LX, LI FZ, et al., 2023. Cloning and expression of anthocyanin-related gene in *Saussurea medusa* Maxim.[J]. Acta Bot Bor-Occid Sin, 40(11): 1840-1846. [郭佳磊，王联星，李凤珍，等，2020．水母雪莲花青素合成相关基因的克隆及表达[J]．西北植物学报，40(11)：1840-1846.]

HANLING W, SUSHENG S, SHANG G, et al., 2024. The NLR immune receptor *ADR*1 and lipase-like proteins *EDS*1 and *PAD*4 mediate stomatal immunity in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 36(2): 427-446.

JIANG XY, SHI G M., DAI WB, et al., 2023. Cloning and Expression of Aerenchyma-related Gene *SmLSD*1 in *Saussurea medusa* Maxim[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 43(4): 550-558.［蒋欣悦，史国民，代吴斌，等，2023．水母雪莲通气组织形成的相关基因 *SmLSD*1 克隆及表达［J］．西北植物学报，43(4)：550-558.］

KONG S, WANG Z, GU YJ, et al., 2008. Research progress on aerenchyma formation in plant roots [J]. Chin Bull Bot, (2): 248-253.［孔妤，王忠，顾蕴洁，等，2008．植物根内通气组织形成的研究进展［J］．植物学通报，(2): 248-253.］

KARPIŃSKI S, SZECHYŃSKA-HEBDA M, WITUSZYŃSKA W, et al., 2013. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants[J]. Plant Cell Environ, 36(4): 736-744.

LORBIECKE R, SAUTER M, 1999. Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice[J]. Plant Physiol, 119: 21-29.

LIU YG, CHEN Y, 2007. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. Bio Techniques, 43(5): 649-656.

LAPIN D, KOVACOVA V, SUN X, et al., 2019. A coevolved EDS1-SAG101-NRG1 module mediates cell death signaling by TIR-Domain immune receptors[J]. Plant Cell, 31(10): 2430-2455.

LAPIN D, BHANDARI DD, PARKER JE, 2020. Origins and immunity networking functions of *EDS*1 family proteins[J]. Annu Rev Phytopathol, 58: 253-276.

LIU YY, DING JY, DENG JQ, et al., 2023. Research progress on PRRs and NLRs mediated immune signaling pathways in plants[J]. Jiangsu Agric Sci, 51(08): 43-50.［刘艳艳，丁颖，郑佳秋，等，2023．植物 PRRs 和 NLRs 介导的免疫信号通路研究进展［J］．江苏农业科学，51(08)：43-50.］

MATEO A, MÜHLENBOCK P, RUSTÉRUCCI C, et al., 2004. Lesion simulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy[J]. Plant Physiol, 136: 2818-2830.

MOLINA C, GROTEWOLD E, 2005. Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters[J]. BMC Genomics, 6(1): 25.

MÜHLENBOCK P, PLASZCZYCA M, PLASZCZYCA M, et al., 2007. Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by lesion simulating disease 1[J]. Plant Cell, 19(11): 3819-3830.

MÜHLENBOCK P, SZECHYNSKA-HEBDA M, PLASZCZYCA M, et al., 2008. Chloroplast signaling and lesion simulating disease 1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 20(9): 2339-2356.

NG DW, ABEYSINGHE JK, KAMALI M. 2018. Regulating the regulators: the control of transcription factors in plant defense signaling[J]. Int J Mol Sci, 24, 19(12): 3737.

NEUBAUER M, SERRANO I, RODIBAUGH N, et al., 2020. *Arabidopsis EDR*1 protein kinase regulates the association of *EDS*1 and *PAD*4 to inhibit cell death[J]. Mol Plant Microbe Interaction, 33(4): 693-703.

PEGADARAJU V, LOUIS J, SINGH V, et al., 2007. Phloem-based resis-tance to green peach aphid is controlled by *Arabidopsis* phytoalexin deficient 4 without its signaling partner enhanced disease susceptibility 1[J]. Plant J, 52(2): 332-341.

PANT SR, KRISHNAVAJHALA A, MCNEECE BT, et al., 2015. The syntaxin 31-induced gene, lesion simulating disease 1 (*LSD*1), functions in Glycine max defense to the root parasite Heterodera glycines[J]. Plant Signal Behav, 10: e977737

PETROV V, HILLE J, MUELLER-ROEBER B, et al., 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants[J]. Front Plant Sci, 6: 69.

PRUITT RN, LOCCI F, WANKE F, 2021. et al., The *EDS*1-*PAD*4-*ADR*1 node mediates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity[J]. Nature, 598(7881): 495-499.

QI X, LI Q, MA X, et al., 2019. Waterlogging-induced adventitious root formation in cucumber is regulated by ethylene and auxin through reactive oxygen species signalling[J]. Plant Cell Environ, 42(5): 1458-1470.

RAJHI I, YAMAUCHI T, TAKAHASHI H, et al., 2011. Dertification of genes expressed in maize root coricalclls during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses[J]. New Phytol, 190(2): 351-368.

RIETZ S, STAMM A, MALONEK S, et al., 2011. Different roles of enhanced disease susceptibility 1 (*EDS*1) bound to and dissociated from *phytoalexin deficient*4 (*PAD*4) in *Arabidopsis* immunity[J]. New Phytol, 191: 107-119.

SINGH K, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L, 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. Curr Opin Plant Biol, 5: 430-436.

SHI SP, HAN F, 2006. Light sources for ultraviolet research and simulation of solar ultraviolet-B[J]. Biotechnol Bull, (S1): 161-166. [师生波，韩发，2006. 紫外光源及太阳 UV-B 辐射的模拟实验[J]．生物技术通报，(S1)：161-166.]

ŚLESAK I, SZECHYŃSKA-HEBDA M, FEDAK H, et al., 2014. PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 affects reactive oxygen species metabolism, cell wall and wood properties in hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *tremuloides*) [J]. Plant Cell Environ, 4(1): 55-61.

SZECHYNSKA-HEBDA M, CZARNOCKA W, HEBDA M, et al., 2016. *PAD*4, *LSD*1 and *EDS*1 regulate drought tolerance, plant biomass production, and cell wall properties[J]. Plant Cell Rep, 35(3): 527-539.

SHI GZ, WANG ZY, SUN Q, et al., 2022. Cloning and activity analysis of *SikCDPK*1 promoter from *Saussurea involucrate*[J]. Biotechnol Bull, 38(9): 191-197. [史光珍，王兆晔，孙琦，等，2022．雪莲 *SikCDPK*1 启动子的克隆和活性分析[J]．生物技术通报，38(9)：191-197.]

SONG N, LIN J, LIU X, et al., 2022. Histone acetyltransferase *TaHAG*1 interacts with T*aPLATZ*5 to activate *TaPAD*4 expression and positively contributes to powdery mildew resistance in wheat [J]. New Phytol, 236(2): 590-607.

TANDON G, JAISWAL S, IQUEBAL MA, et al., 2015. Evidence of salicylic acid pathway with *EDS*1 and *PAD*4 proteins by molecular dynamics simulation for grape improvement[J]. J Biomol Struct Dyn, 33: 2180-2191.

WIERMER M, FEYS BJ, Parker JE, 2005. Plant immunity: the *EDS*1 regulatory node[J]. Curr Opin Plant Biol, 8(4): 383-389.

WANG WH, YU JJ, TIAN HL, 2007. Comparative studies on the anatomical structures of leave of 3 species in *Saussurea*[J]. Bull Bot Res, 27(3): 275-278. [王文和，于建军，田晔林，2007．风毛菊属 3 种植物叶的解剖结构比较[J]．植物研究，27(3)：275-278.]

WITUSZYNSKA W, SLESAK I, VANDERAUWERA S, et al., 2013. Lesion simulating disease 1, enhanced disease susceptibility 1, and phytoalexin deficient 4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency, and seed yield in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 161: 1795-1805.

WANG J, SHINE MB, GAO QM, et al., 2014. Enhanced disease susceptibility1 mediates pathogen resistance and virulence function of a bacterial effector in *soybean*[J]. Plant Physiol, 165(3):1269-1284.

WITUSZYŃSKA W, SZECHYŃSKA-HEBDA M, SOBCZAK M, et al., 2015. Lesion simulating disease 1 and enhanced disease susceptibility 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Environ, 38: 315-330.

WEI L, LIU JL, 2021. Overview of research on protein subcellular localization in plants[J]. Plant Sci, 39(01): 93-101. [未丽，刘建利，2021．植物蛋白质亚细胞定位相关研究概述［J］．植物科学学报，39(01)：93-101.]

WITOŃ D, SUJKOWSKA-RYBKOWSKA M, DĄBROWSKA-BRONK J, et al., 2021. Mitogen-activated protein kinase 4 impacts leaf development, temperature, and stomatal movement in hybrid aspen[J]. Plant Physiol, 186(4): 2190-2204.

WU ZQ, CHEN W, ZHAO Z, et al., 2024. Genome-Wide identification and bioinformatics analysis of *GRAS* gene family in *Maize*[J]. J Agric Sci Technol, 26(3): 15-25. [吴占清，陈威，赵展，等，2024．玉米 GRAS 基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]．中国农业科技导报，26(3)：15-25.]

WANG HL, SONG SS, GAO S, et al., 2024. The NLR immune receptor *ADR*1 and lipase-like proteins *EDS*1 and *PAD*4 mediate stomatal immunity in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 36(2): 427-446.

YOUSSEF RM, MACDONALD MH, BREWER EP, et al., 2013. Ectopic expression of *AtPAD*4 broadens resistance of *soybean* to *soybean* cyst and root-knot nematodes[J]. BMC Plant Biol, 13(1): 67.

YAMAUCHI T, WATANABE K, FULAZAWA A, et al., 2014. Ethylene and reacive oxygen species are involved in oot aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions[J]. J Exp Bot, 65(1): 261-273.

ZHU JW, 2014. Efect of aerenchyma for mmationrelated genes on growth and nitrogen utilizathon in *rice* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural: 55-58. [朱静雯，2014．通气组织形成相关基因对水稻生长和氮素利用的影响研究［D］．南京：南京农业大学：55-58.]

ZENG HY, LIU Y, CHEN DK, et al., 2021. The immune components enhanced disease susceptibility 1 and phytoalexin deficient 4 are required for cell death caused by overaccumulation of ceramides in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 107(5): 1447-1465.

ZHI TT, ZHOU Z, HAN CY, et al., 2022. *PAD*4 mutation accelerating programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* tyrosine degradation deficient mutant sscd1[J]. Chin Bull Bot, 57(3): 288-298. [支添添，周舟，韩成云，等，2022．*PAD*4 突变加速拟南芥酪氨酸降解缺陷突变体 sscd1 的程序性细胞死亡[J]．植物学报，57(3)：288-298.]